

### 114. Helmut Holzer und Erika Holzer: Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in *Chlorella*\*)

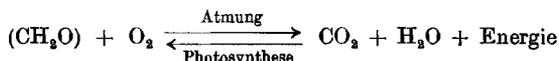
[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Laboratoriums der Universität München]

(Eingegangen am 28. Februar 1952)

In Extrakten aus Acetontrockenpulver von *Chlorella pyrenoidosa* werden Fermente nachgewiesen, die den Kohlenhydratabbau von Hexosemonophosphat über Hexosediphosphat und Triosephosphat zu Phosphoglycerinsäure katalysieren. Die Bedeutung dieser Befunde für den Mechanismus des photosynthetischen Kohlenhydrataufbaues wird diskutiert.

Seit der Formulierung und experimentellen Begründung der Dehydrierungstheorie durch Heinrich Wieland<sup>1)</sup> sind Dehydrierungsvorgänge als in der gesamten belebten Natur verifiziertes Prinzip der biologischen Oxydation erkannt worden. Wieland hat bereits 1913 die Umkehrbarkeit solcher Dehydrierungsvorgänge mit Modellversuchen und an biologischem Material gezeigt<sup>2)</sup>, und wir wissen heute, daß der Substanzumbau in der lebenden Zelle, z. B. der reversible Übergang von Kohlenhydrat in Fettsäuren, im wesentlichen auf das Zusammenwirken von Dehydrierungs- und Hydrierungsreaktionen zurückzuführen ist.

Die Bedeutung dieser Erkenntnisse für den Mechanismus der pflanzlichen Photosynthese ist erst im letzten Jahrzehnt erkannt worden. Betrachtet man die Bilanzreaktion der durch Dehydrierungen, hydrolytische C—C-Spaltungen und Decarboxylierungen ermöglichten Kohlenhydratoxydation bei der Atmung, so erkennt man, daß die Bilanzreaktion der Photosynthese in einer Umkehrung dieses Prozesses besteht:



Bei dieser Sachlage ist die Annahme naheliegend, daß die Photosynthese auch in ihrem detaillierten Mechanismus durch Umkehrung der Atmungsvorgänge erreicht wird<sup>3)</sup>, oder daß zumindest die genannten Reaktionstypen der Atmung bei der Photosynthese in umgekehrter Richtung beteiligt sind.

Experimentelle Belege hierfür sind in den letzten 12 Jahren durch folgende grundlegende Beobachtungen erbracht worden:

1.) R. Hill hat 1939 gezeigt, daß die primäre Lichtreaktion in einer durch das Chloroplasten-System katalysierten und durch Lichtquanten energetisch ermöglichten Zerlegung von Wasser besteht. Hierbei wird Sauerstoff entwickelt und zu Hydrierungen befähigter Wasserstoff zur Verfügung gestellt<sup>4)</sup>.

\*) Herrn Geheimrat Professor Dr. Heinrich Wieland zum 75. Geburtstag in ergebener Dankbarkeit gewidmet. <sup>1)</sup> B. 45, 484 [1912]. <sup>2)</sup> B. 46, 3327 [1913].

<sup>3)</sup> S. Ochoa, Currents in Biochemical Research, New York 1946, S. 165.

<sup>4)</sup> R. Hill, Proc. Roy. Soc. London B 127, 192 [1939].

2.) Insbesondere den Arbeiten von S. Ochoa<sup>3)</sup> verdanken wir die Erkenntnis, daß die an der Kohlenhydratoxydation beteiligten Decarboxylierungsvorgänge reversibel sind, und daß bei Koppelung mit geeigneten energieliefernden Systemen eine CO<sub>2</sub>-Fixierung *in vitro* erreicht werden kann.

3.) F. Lynen und N. Zöllner<sup>5)</sup> haben vor kurzem gezeigt, daß die für die Umkehrung verschiedener Dehydrierungen und oxydativer Decarboxylierungen notwendige Adenosintriphosphorsäure in Chlorella-Zellen durch den Mechanismus der Atmungskettenphosphorylierung geliefert werden kann. Hierbei wird Adenosintriphosphat aus Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat synthetisiert unter Ausnutzung der Energie, die bei der Wasserstoffübertragung auf Sauerstoff im Zuge der Atmung verfügbar wird. Versuche mit Dinitrophenol ergaben, daß die Atmungskettenphosphorylierung für die Photosynthese in Chlorella notwendig ist<sup>6)</sup>. Vermutlich werden bei der Photolyse des Wassers wasserstoffübertragende Cofermente hydriert<sup>7)</sup> und die Reoxydation des Wasserstoffs gibt dann Anlaß zur Atmungskettenphosphorylierung. Eine Beteiligung von Phosphat an der Photosynthese in Chlorella war bereits durch Versuche von O. Kandler nachgewiesen worden<sup>8)</sup>.

4.) Durch Versuche mit radioaktivem Kohlendioxyd sind verschiedene Zwischenprodukte des Kohlenhydratabbaues in tierischem Gewebe (insbesondere Phosphoglycerinsäure und phosphorylierte Hexosen) als Zwischenprodukte der Photosynthese bei Chlorella und höheren Pflanzen sichergestellt worden<sup>9)</sup>.

Neben den genannten Befunden ist für Theorien über den Mechanismus der Photosynthese die Kenntnis der in Pflanzen vorliegenden Enzymsysteme eine unerläßliche Grundlage. Erst durch Anwesenheit der spezifischen Fermente werden ja die ohne Katalysator unendlich langsam ablaufenden chemischen Reaktionen in der Zelle so beschleunigt, daß die beobachteten beträchtlichen Stoffumsätze zutage treten. Da Katalysatoren ganz allgemein Reaktionen in beiden Richtungen beschleunigen, ist es hierbei belanglos, ob man eine enzymatisch katalysierte Reaktion in der einen oder in der anderen Richtung nachweist. Maßgebend für die Richtung, in der eine Reaktion im „Multi-enzymssystem“ der lebenden Zelle durchlaufen wird, ist lediglich die thermodynamisch bedingte Gleichgewichtskonstante und die durch Angebot von Substraten und die Koppelung mit anderen Enzymsystemen bedingte Konzentration der beteiligten Reaktionspartner.

### Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme der einzelligen Grünalge *Chlorella pyrenoidosa* untersucht, da an diesem Objekt in den letzten Jahrzehnten besonders viele Beobachtungen über die Energetik und den Chemismus der

<sup>5)</sup> Unveröffentlichte Versuche, s.a. <sup>6)</sup>, S. 429.

<sup>6)</sup> H. Holzer, *Ztschr. Naturforsch.* 6b, 424 [1951].

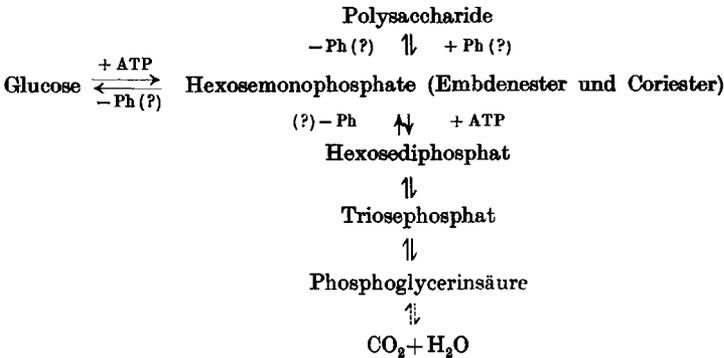
<sup>7)</sup> S. Ochoa u. W. Vishniac, *Nature* [London] 167, 768 [1951].

<sup>8)</sup> *Ztschr. Naturforsch.* 5b, 423 [1950].

<sup>9)</sup> J. A. Bassham, A. A. Benson u. M. Calvin, *Journ. biol. Chem.* 185, 781 [1950].

Photosynthese gesammelt worden waren. Gerade bei Chlorella liegen aber keine Untersuchungen über den Enzymbestand vor. In Acetonpulverextrakten konnten wir Fermente nachweisen, die Glucose und Embdenester mit Adenosintriphosphat zu Hexosemonophosphat bzw. Fructose-1.6-diphosphat phosphorylieren können. Fructosediphosphat wird dann weiter durch Aldolase und Triosephosphatdehydrase in Phosphoglycerinsäure übergeführt. Das letztgenannte Enzym wurde etwas näher charakterisiert. Es verhält sich bezüglich der Jodessigsäurehemmung und der Notwendigkeit von Diphosphopyridinnucleotid als Coferment gleich wie die aus Hefe und tierischem Gewebe isolierte Triosephosphatdehydrase. Auch das in vielen anderen Organismen als erstes Produkt des Polysaccharidabbaues auftretende Glucose-1-phosphat kann von Chlorella-Zellen unter Beteiligung von Adenosintriphosphat über das Aldolase-Triosephosphatdehydrase-System oxydativ abgebaut werden. Eine Phosphorylase, die Glucose-1-phosphat in mit Jod anfärbbare Polysaccharide überführt, konnte in den Acetonpulverextrakten nicht nachgewiesen werden. Eventuell werden primär Disaccharide gebildet, wofür auch Befunde mit <sup>14</sup>C-markiertem CO<sub>2</sub> an pflanzlichem Material sprechen. Zweifellos kann man aus unseren Versuchen schließen, daß in Chlorella Fermentsysteme vorhanden sind, die den Kohlenhydratabbau nach demselben oder einem sehr ähnlichen Schema katalysieren, wie es in Hefe und tierischem Gewebe verifiziert ist (s. das folgende Schema).

Kohlenhydratabbau in Chlorella\*)



\*) Das Schema gibt nur die von uns sichergestellten Befunde wieder. Ph = anorganisches Phosphat, ATP = Adenosintriphosphat.

Eine quantitative Aussage über die Bedeutung des angeführten Abbauweges für den Kohlenhydratumsatz in Chlorella können wir vorerst nicht machen. Aus der Zusammenstellung der in unseren Versuchen erzielten Q<sub>O<sub>2</sub></sub>-Werte für die einzelnen Fermente bzw. Fermentsysteme (jeweils umgerechnet auf den für Glucoseoxydation zu erwartenden Q<sub>O<sub>2</sub></sub>-Wert bei Annahme eines Abbaues zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O wie im obigen Schema dargestellt), ersieht man, daß die in Acetonpulverextrakten erzielten Umsatzgrößen stark differieren, aber größenordnungsmäßig an die Q<sub>O<sub>2</sub></sub>-Werte der intakten Zelle heranreichen (Tafel 1, S. 658).

Tafel 1. Vergleich der  $QO_2$ -Werte bei lebenden Zellen und den untersuchten Fermentextrakten

Substrat	Testmethode	Enzymquelle	$QO_2$ -Wert bez. auf	Vers.	$QO_2$ Glucose $\left[ \frac{\text{emm } O_2}{\text{Stdn.}} \text{ bei } 30^\circ \right]$
Fructose-di-phosphat	Cori	Gefrorene Zellen	1 mg gefrorene Zellen	Taf. 2	5.3
"	"	Acetonpulver-extrakt	1 mg Acetonpulver	Taf. 3	15.6
"	Sibley u. Lehninger.	Acetonpulver-extrakt	1 mg Acetonpulver	Taf. 4	68
"	Methylenblau	Acetonpulver-extrakt	1 mg Acetonpulver	Taf. 6	8.5
Embdenester + ATP	Sibley u. Lehninger	Acetonpulver-extrakt	1 mg Acetonpulver	Taf. 4	40
"	Methylenblau	Acetonpulver-suspension	1 mg Acetonpulver	Taf. 7	64
Glucose + ATP	7 Min. Phosphat	Acetonpulver-extrakt	1 mg Acetonpulver	Taf. 5	6.4
Endogene Atmung ( $-O_2$ )		Lebende Zellen	1 mg Trocken-gewicht	6)	10-20
Glucoseoxydation ( $-O_2$ )		Lebende Zellen	1 mg Trocken-gewicht	6)	30-50
Photosynthese (+ $O_2$ )		Lebende Zellen	1 mg Trocken-gewicht	6)	60-100

Vermutlich ist die Aktivität wesentlich höher, da durch die Acetonbehandlung ein Teil der ursprünglich vorhandenen Fermente denaturiert wird und weiterhin nur ein Bruchteil der im Trockenpulver vorliegenden Fermente in Lösung gebracht werden kann. Dies läßt sich ohne weiteres durch Versuche mit Hefeacetonpulver beweisen. Auch hier liegen in Extrakten die von uns untersuchten Fermente in viel geringerer Aktivität vor, als es zur Erklärung des Stoffwechsels der lebenden Hefezelle notwendig wäre. Für Hefezellen ist aber durch eine große Zahl von Untersuchungen sichergestellt, daß hier tatsächlich das obige Schema quantitativ den oxydativen Kohlenhydratabbau wiedergibt<sup>10)</sup>. Bei den von uns durchgeführten Versuchen kam es lediglich darauf an, qualitativ zu zeigen, daß die Fermente des angeführten Schemas in Chlorella-Zellen vorliegen<sup>11)</sup>. Daß diese Befunde nicht universell für pflanzliches Gewebe gelten, haben S. Tewfik und P. K. Stumpf<sup>12)</sup> gezeigt. Nach den Arbeiten dieser Autoren fehlt z.B. das Triosephosphatdehydrase-System in einer Reihe von Organen höherer Pflanzen.

Bedenkt man die eingangs erwähnte Fähigkeit der Fermente, Reaktionen in beiden Richtungen zu katalysieren, so sind unsere Versuche als weiteres Argument für die Anschauung zu werten, daß die Photosynthese in einer Umkehrung der Atmungsvorgänge besteht. Insbesondere die Umkehrung der Triosephosphatdehydrierung, die zur Entstehung von Phosphoglycerinaldehyd

<sup>10)</sup> Siehe z. B. F. Lynen u. R. Koenigsberger, A. 569, 129 [1950].

<sup>11)</sup> Vorläufige Versuche an lebenden Chlorella-Zellen haben ergeben, daß bei etwa 50 % Hemmung der Glucoseoxydation durch Jodessigsäure sich eine stationäre Konzentration an Fructosediphosphat in den Zellen einstellt, die etwa 10mal höher ist als die Konzentration in unvergifteten Zellen. Dies spricht dafür, daß der Glucoseabbau über Triosephosphat ein Hauptweg in Chlorella ist.

<sup>12)</sup> Journ. biol. Chem. 192, 519 [1951].

aus einem der primären Photosyntheseprodukte – Phosphoglycerinsäure – führt, scheint uns in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Durch die Existenz der Aldolase in *Chlorella*-Zellen ist von Phosphoglycerinaldehyd aus der Aufbau von Kohlenhydrat bei der Photosynthese verständlich.

Problematisch ist hierbei der Übergang Fructosediphosphat  $\rightarrow$  Hexosemonophosphat. Beim Kohlenhydratabbau wird dieser Reaktionsschritt durch Phosphorylierung mit Adenosintri-phosphat erreicht, eine Reaktion, deren Gleichgewicht so weit auf seiten des Fructosediphosphates liegt, daß sie als praktisch irreversibel betrachtet werden kann. Beim Kohlenhydrataufbau könnte eine Phosphatase am Werke sein: Fructosediphosphat  $\rightarrow$  Fructosemonophosphat + anorganisches Phosphat. Der Verlust an freier Energie bei dieser Reaktion beträgt etwa 3 kcal je Mol synthetisierter Kohlenhydrateinheit; er wäre auch mit Rücksicht auf die annähernd quantitative Energieausbeute bei der Photosynthese<sup>13)</sup> tragbar.

### Beschreibung der Versuche

#### I. Substrate, Enzympräparate und Testmethoden

Zur Bereitung von Aceton-trockenpulver wurden 3–5 Tage alte *Chlorella*-Zellen (Züchtungsbedingungen s.<sup>9)</sup>) mit dest. Wasser gewaschen, scharf abzentrifugiert und 2–3 mal mit dem etwa 50fachen Vol. eiskaltem Aceton durchgerührt; der grün gefärbte Aceton-extrakt wurde nach dem Zentrifugieren jeweils verworfen. Der Bodensatz wurde im Vakuumexsiccator bei 0° getrocknet; das gewonnene grüne Pulver konnte bei –18° mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Adenosintri-phosphat (ATP), Embdenester (Gleichgewichtsgemisch von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-phosphat), Coriester und Fructosediphosphat waren im hiesigen Laboratorium dargestellt worden. Wir verdanken die Überlassung dieser Substanzen der Freundlichkeit von Hrn. Prof. Dr. F. Lynen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch eine Kombination der Testmethoden von Cori<sup>14)</sup>, E. Racker<sup>15)</sup> und E. C. Slater<sup>16)</sup>. Zur Eichung des Aldolase-Testes nach J. A. Sibley und A. L. Lehninger<sup>17)</sup> wurde mehrmals umkristallisierte Aldolase aus Kaninchenmuskel nach Cori<sup>14)</sup> dargestellt. Diphosphopyridinnucleotid (50%) wurde nach S. Williamson und D. E. Green<sup>18)</sup> aus Hefe gewonnen.

Zur Bestimmung der Aldolaseaktivität im Acetonpulver wurde entweder das aus Fructosediphosphat entstehende Triosephosphat nach Cori<sup>14)</sup> mit Cyanid abgefangen und als alkalilabiles Phosphat bestimmt, oder das Dinitrophenylhydrazon der mit Hydrazin abgefangenen und mit Alkali behandelten Triosephosphate nach Sibley und Lehninger colorimetrisch bestimmt<sup>17)</sup>.

Die Hexokinaseaktivität wurde nach Incubation mit Glucose und ATP durch Bestimmung der Abnahme des in 7 Min. bei 100° in 1*n*HCl hydrolysierbaren Phosphates (7 Min. Phosphat) erfaßt.

Zur Bestimmung der Triosephosphatdehydrase-Aktivität wurde die Thunbergsche Acceptor-methode unter Verwendung der üblichen Gefäße mit Methylenblau als Wasserstoff-acceptor benützt.

#### II. Nachweis der Enzyme

##### Nachweis von Aldolase mit dem Test von Cori<sup>14)</sup>

a) Mit flüssiger Luft aufgeschlossene *Chlorella*-Zellen: Frisch geerntete *Chlorella*-Zellen wurden mit dest. Wasser gewaschen, scharf zentrifugiert und in flüssige

<sup>13)</sup> O. Warburg u. D. Burk, Arch. Biochem. 25, 410 [1950].

<sup>14)</sup> G. T. Cori, M. W. Slein u. C. F. Cori, Journ. biol. Chem. 173, 597, 605 [1948].

<sup>15)</sup> Journ. biol. Chem. 167, 843 [1947].

<sup>16)</sup> Biochem. Journ. 50, VII [1951].

<sup>17)</sup> Journ. biol. Chem. 177, 859 [1949].

<sup>18)</sup> Journ. biol. Chem. 135, 345 [1940].

Luft eingetragen. Sofort nach dem Auftauen wurden 0.3 ccm Suspension mit 15  $\mu$ Mol Fructosediphosphat, 12 ccm  $m/_{10}$  Glykokoll-NaOH-Puffer ( $p_H$  9.0) enthaltend  $m/_{10}$  KCN und Wasser auf 24 ccm bei 30° incubiert. Die Entnahme der Nullproben erfolgte unmittelbar nach dem Enzymzusatz; weitere Proben wurden nach 5, 10, 15 und 20 Min. entnommen (je 3.0 ccm). Es wurde jeweils das mit 1  $n$  NaOH in 20 Min. bei Zimmertemperatur abspaltbare Phosphat bestimmt („alkalilabiles Phosphat“ = Triosephosphat) und nach 0 und 20 Min. das ohne Natriumhydroxyd-Einwirkung erfassbare anorganische Phosphat. Phosphatbestimmungen erfolgten colorimetrisch nach M. Martland und R. Robison<sup>19</sup>). Die in der Tafel angegebenen Phosphatwerte sind auf den Gesamtansatz umgerechnet.

Um zu prüfen, ob die Aldolaseaktivität in der flüssigen Phase der aufgetauten Suspension vorliegt, wurde bei 0° 15 Min. mit 15000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert; in dem angegebenen Ansatz wurden 0.3 ccm klares, grünelbes Filtrat, in einem weiteren Ansatz 0.3 ccm mit Wasser auf das Ausgangsvolumen resuspendierte, zentrifugierbare Partikel verwendet.

Tafel 2. Aldolase in mit flüssiger Luft aufgeschlossenen Chlorella-Zellen

Zeit in Minuten	0	5	10	15	20	Enzymquelle
$\mu$ Mol anorgan. Phosphat	38.0	—	—	—	38.5	} sofort nach Auftauen erhaltene Suspension
$\mu$ Mol alkalilabiles Phosphat	0	1.9	3.8	4.7	5.2	
$\mu$ Mol Fructosediphosphat umgesetzt	0	0.95	1.9	2.35	2.6	
$\mu$ Mol anorgan. Phosphat	40.2	—	—	—	40.5	} Filtrat
$\mu$ Mol Fructosediphosphat umgesetzt	0	0.1	0.5	0.3	0.3	
$\mu$ Mol anorgan. Phosphat	35.1	—	—	—	37.9	} in Wasser resuspendierte Partikel
$\mu$ Mol Fructosediphosphat umgesetzt	0	1.1	2.0	2.3	2.6	

b) Extrakte aus Acetonpulver: 150 mg Chlorella-Acetonpulver wurden mit 1.0 ccm 0.26-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung 30 Min. bei 0° digeriert. Zur Incubation gelangten 0.35 ccm des nach hochtourigem Zentrifugieren erhaltenen Filtrates mit 7.5  $\mu$ Mol Fructosediphosphat und 5 ccm  $m/_{10}$  Glykokoll- $m/_{10}$  KCN-Puffer ( $p_H$  9.0) bei 30° (mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt). Probeentnahme und Aufarbeitung wie bei Versuch a). Alle Angaben in der Tafel 3 sind auf den Gesamtansatz umgerechnet.

Zur Anreicherung der Proteine durch Acetonfällung wurden 200 mg Acetonpulver wie vorstehend mit 2 ccm 0.13-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung digeriert. Nach Zentrifugieren erhielt man 1.2 ccm klares Filtrat, die bei 0° mit 4.8 ccm Aceton versetzt wurden. Nach dem Trocknen der Fällung wurde in 1.0 ccm 0.13-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen und das Unlösliche durch Zentrifugieren bei 0° abgetrennt. Die Protein-Bestimmung durch Messung der Lichtabsorption bei 260 und 280  $m\mu$ .<sup>20</sup>) ergab 2.2 mg Protein/ccm. 0.5 ccm des Filtrates wurden wie oben mit Fructosediphosphat incubiert; Gesamtvolumen des Ansatzes 10 ccm.

Tafel 3. Aldolase in Acetonpulverextrakten

Zeit in Minuten	0	15	30	Enzymquelle
$\mu$ Mol anorgan. Phosphat	16.0	—	—	Acetonpulverextrakt direkt
$\mu$ Mol alkalilabiles Phosphat	0	2.9	4.5	
$\mu$ Mol Fructosediphosphat umgesetzt	0	1.45	2.25	
$\mu$ Mol anorgan. Phosphat	2.5	—	—	Acetonfällung aus Acetonpulverextrakt
$\mu$ Mol alkalilabiles Phosphat	0	2.5	4.0	
$\mu$ Mol Fructosediphosphat umgesetzt	0	1.25	2.0	

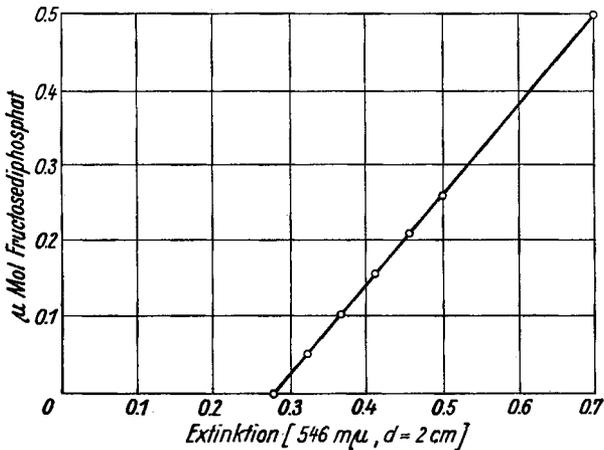
<sup>19</sup>) Biochem. Journ. 20, 848 [1926].

<sup>20</sup>) O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Ztschr. 310, 384 [1941]; H. M. Kalckar, Journ. biol. Chem. 167, 462 [1947].

Nachweis von Aldolase und Phosphohexokinase mit dem Test von Sibley und Lehninger

200 mg Acetonpulver wurden mit 3.3 ccm 0.26-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert und zum Ansatz 0.5 ccm Filtrat mit 0.75 ccm 0.56 m Hydrazinsulfat ( $\text{pH}$  9.0) und 0.5 ccm  $m/6$  Phosphatpuffer ( $\text{pH}$  8.0) bei  $30^\circ$  incubiert. Zusätze: 0.10 ccm  $m/18$  Fructosediphosphat (FDP), 0.10 ccm  $m/10$  Embdenester, 0.30 ccm 0.07 m  $\text{MgCl}_2$ , 0.10 ccm  $m/10$  ATP. Gesamtvolumen aller Ansätze nach Auffüllen mit Wasser 7.0 ccm. Probeentnahme: je 1.35 ccm zu 0.15 ccm 50-proz. Trichloressigsäure (TES) pipettiert. Mit 1.5 ccm 0.75 n NaOH 10 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen, mit 1.5 ccm 0.1% Dinitrophenylhydrazin in 2 n HCl 10 Min. bei  $38^\circ$  incubiert, mit 10 ccm 0.75 n NaOH versetzt und nach 8–12 Min. die Extinktion bei 546  $m\mu$  bestimmt (Schichtdicke 2 cm); Ergebnisse siehe Tafel 4.

Zur Eichung des Testes von Sibley und Lehninger wurden je 0.05 bis 0.5  $\mu\text{Mol}$  Fructosediphosphat mit Wasser auf 1.1 ccm aufgefüllt und mit 0.15 ccm 0.56 m Hydrazinsulfat, 0.10 ccm 3 m Glykokollpuffer ( $\text{pH}$  9.0) und 0.01 ccm Aldolase-Lösung (enthaltend 45  $\gamma$  krist. Enzym aus Kaninchenmuskel) 10 Min. bei  $30^\circ$  incubiert. Hierauf wurde mit 0.15 ccm 50-proz. TES abgestoppt, wie oben mit NaOH und Dinitrophenylhydrazin incubiert und die Extinktion bei 546  $m\mu$  bestimmt. Das überschüssig vorhandene Enzym führt zum quantitativen Umsatz, so daß die erhaltenen Extinktionen direkt zum eingesetzten Fructosediphosphat in Beziehung gesetzt werden können; Ergebnisse siehe die Abbildung.



Abbild. Eichkurve zur Fructosediphosphat-Bestimmung nach Sibley u. Lehninger

Tafel 4. Aldolase und Phosphohexokinase im Acetonpulverextrakt

Ansatz zur Bestimmung von	Aldolase		Phosphohexokinase		Aldolase-Spaltung von Embdenester	
	Zusätze		10 $\mu\text{Mol}$ Embdenester 10 $\mu\text{Mol}$ ATP 21 $\mu\text{Mol}$ $\text{MgCl}_2$		10 $\mu\text{Mol}$ Embdenester	
Zeit in Min. nach Enzymzusatz	10	20	10	20	10	20
Extinktionsdifferenz gegen Nullwert $\mu\text{Mol}$ Fructosediphosphat bzw. Embdenester umgesetzt je Probe	0.41	0.61	0.24	0.36	0.01	0.02
	0.49	0.73	0.29	0.43	0.01	0.02

## Nachweis von Hexokinase

Nach Extraktion von 300 mg Acetonpulver mit 6 ccm 0.26-proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung wurden 1.0 ccm des Filtrates mit 1.0 ccm Trimethylol-aminomethan-Puffer ( $\text{pH}$  8.0), ATP, Glucose und Wasser auf 9.0 ccm aufgefüllt; Incubation bei 30°. Zur Probeentnahme wurden je 2 ccm (nach 0, 15 und 30 Min.) mit 0.2 ccm 50-proz. TES abgestoppt. Nach Zentrifugieren wurden je 0.9 ccm zur Bestimmung von anorgan. Phosphat und von in 7 Min. bei 100° in 1*n*HCl hydrolysierbarem Phosphat (7 Min.  $\text{PO}_4$ ) eingesetzt.

Tafel 5. Hexokinase im Acetonpulverextrakt

Ansatz zur Bestimmung von	Glucokinase		Kontrolle	
Zusätze	9 $\mu\text{Mol}$ ATP 1.6 mMol Glucose		9 $\mu\text{Mol}$ ATP	
$\mu\text{Mol PO}_4$ /Gesamtansatz	anorg. $\text{PO}_4$	7 Min. $\text{PO}_4$	anorg. $\text{PO}_4$	7 Min. $\text{PO}_4$
0 Min.	8.05	18.0	8.00	17.8
15 Min.	8.95	16.8	9.05	17.7
30 Min.	9.30	15.6	9.4	17.6

## Methylenblauversuche

a) Nachweis von Aldolase und Triosephosphatdehydrase: 0.2 ccm Filtrat aus Extrakt von Acetonpulver wie vorstehend bei Hexokinase wurden mit 0.3 ccm  $m/5$  Phosphatpuffer  $\text{pH}$  8.0 und den in der Tafel 6 angegebenen Zusätzen und Wasser auf 1.15 ccm aufgefüllt. Im Kipper 0.1 ccm  $m/500$  Methylenblau; Incubation bei 30°. Die in der Tafel 6 angegebenen Konzentrationen der Zusätze sind Endkonzentrationen nach Einkippen des Methylenblaus.

Tafel 6. Aldolase und Triosephosphatdehydrase

Gefäß Nr.	1	2	3	4
$m/80$ Fructosediphosphat	+	+	+	-
$m/750$ Diphosphopyridinnucleotid (DPN)	+	-	+	+
$m/300$ Jodacetat	-	-	+	-
Zeit für 90% Entfärbung in Minuten	17.5	70	>100	>100

b) Nachweis von Phosphohexokinase: 50 mg Acetonpulver wurden in 1 ccm 0.26-proz.  $\text{NaHCO}_3$  10 Min. bei 0° digeriert und je 0.1 ccm der Suspension mit 0.1 ccm 0.07 *m*  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 ccm  $m/5$  Phosphatpuffer  $\text{pH}$  8.0 und den angegebenen Zusätzen auf 0.9 ccm aufgefüllt. Im Kipper befanden sich 0.1 ccm  $m/500$  Methylenblau; Incubation bei 30°. Die visuelle Bestimmung der Entfärbungszeit durch Farbvergleich ist durch die grüne Farbe der Suspension etwas erschwert, aber trotzdem leicht mit einer Genauigkeit von  $\pm 10\%$  möglich.

Tafel 7. Phosphohexokinase, Aldolase und Triosephosphatdehydrase

Gefäß Nr.	1	2	3	4	5
$m/60$ Fructosediphosphat	+	+	-	-	-
$m/50$ Embdenester	-	-	+	-	+
$m/500$ ATP	-	-	+	+	-
$m/2000$ DPN	+	-	+	+	+
Zeit für 70% Entfärbung in Minuten	3	35	3.5	9	11

c) Oxydation von Coriester über das Triosephosphatdehydrase-Methylenblau-System: Acetonpulversuspension und Incubation wie bei Versuch b); Zusätze siehe Tafel 8.

Tafel 8. Oxydativer Umsatz von Coriester

Gefäß Nr.	1	2	3	4	5
$m/_{50}$ Coriester	+	+	-	+	-
$m/_{200}$ ATP	+	-	+	+	+
$m/_{2000}$ DPN	+	+	+	+	+
$m/_{300}$ Jodacetat	-	-	-	+	+
Zeit für 80% Entfärbung in Minuten	8.5	16	12	12	16

### 115. Alfred Bertho und Alois Stoll: Bärlapp-Alkaloide, I. Mitteil.: Zur Kenntnis der Alkaloide aus *Lycopodium annotinum* L\*) \*\*)

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität München, Außenstelle Weilheim/Obb. und München]

(Eingegangen am 10. März 1952)

In einheimischem *Lycopodium annotinum* L. wurden sieben Alkaloide aufgefunden und durch Salze, UV-Absorptionsspektren usw. charakterisiert. Acrifolin  $C_{16}H_{23}O_2N$ , Annotinin  $C_{16}H_{21}O_3N$  und Lycopodin  $C_{16}H_{25}ON$  sind bereits bekannt; Annotin  $C_{16}H_{23}O_4N$ , Annotoxin  $C_{31}H_{42}O_5N_2$ , eine weitere mit Lycopodin isomere Base  $C_{16}H_{25}ON$  und eine Base  $C_{10}H_{19}[21]ON$  sind bisher nicht beobachtet worden. Es werden verschiedene Umsetzungen beschrieben, u. a. ein Abbau eines Umwandlungsproduktes des Acrifolins.

Die Bärlappgewächse (*Lycopodiaceen*<sup>1)</sup>) sind mit sechs Arten, *Lycopodium annotinum* L. (sprossender Bärlapp), *L. clavatum* L. (Kolbenbärlapp, Wolfsranke), *L. complanatum* L. (flacher Bärlapp), *L. inundatum* L. (Sumpfbärlapp), *L. alpinum* L. (Alpenbärlapp) und *L. selago* L. (Tannenbärlapp) nebst 44 Formen und Varietäten in Mitteleuropa heimisch, wovon die beiden ersten Arten, *L. annotinum* und *L. clavatum*, wegen ihrer meterlangen, immergrünen, weit über den Boden hinkriechenden Stengel unter der Bezeichnung Schlangenmoos am bekanntesten sind. Auf die Verwendung der Bärlappgewächse, vor allem von *L. clavatum* und dessen reifen Sporen (Hexenmehl), die sich in keulenförmigen Sporophyllständen befinden, in der Volksmedizin bei Hauterkrankungen, Blasenleiden usw. kann hier nur kurz hingewiesen werden. Bekannt ist die offizinelle Verwendung des Sporenpulvers als Pillenstreumittel und sein Gebrauch bei physikalischen Versuchen. In der exakten Medizin dürften indessen die Bärlappgewächse nur wenig verwendet werden, weil ihre arzneiliche Wirksamkeit zu wenig erforscht ist.

Immerhin sind schon im älteren Schrifttum ganz vereinzelt Arbeiten vorhanden, die in der berechtigten Vermutung, daß sich die Wirksamkeit auf Alkaloide zurückführen ließe, sich mit einigem Erfolg mit der Isolierung von Lycopodium-Alkaloiden befassen. Die dann nach einer langen Zeitspanne von rund einem halben Jahrhundert seit 1938 erschienenen Arbeiten über Lycopo-

\*) Diese Untersuchung ist Herrn Geheimrat Professor Dr. H. Wieland zum 75. Geburtstag gewidmet.

\*\*\*) Der Inhalt der vorliegenden Arbeit ist zum größeren Teil der Dissertat. von A. Stoll, Universität München, 1952, entnommen. Dies betrifft in der Hauptsache alle Befunde über Annotin, Acrifolin und Annotinin. Dort sind auch weitere Angaben zu entnehmen.

<sup>1)</sup> Erschöpfenden Aufschluß über diese Pflanzenfamilie gibt das Werk von H. Nessel, Die Bärlappgewächse (*Lycopodiaceae*) (Gustav Fischer, Jena 1939).